

急性肝不全における腎臓の役割 (Guanidino 化合物と肝腎の代謝関係)

岡山大学医学部麻酔学教室 (指導: 小坂二度見教授)

西 谷 恭 子

(昭和60年11月19日受稿)

Key words: 急性肝不全, 尿素サイクル, アルギニン,
Guanidino 酢酸, Guanidino 酪酸

緒 言

代謝における臓器の機能相関についての研究が進むにつれ, アルギニン代謝においては, 肝臓と腎臓とでの代謝の間に関係があることが明らかとなっている¹⁾. アルギニンは Guanidino 酢酸 (guanidino acetic acid, 以下 GAA と略す) をはじめ, 種々の Guanidino 化合物合成の基質になると考えられている²⁾. 一方急性腎不全および急性肝不全の患者の血清 Guanidino 化合物の分析を行って, 肝臓・腎臓の病態により, 数種の Guanidino 化合物の間に関連ある変動があることをすでに報告した^{3),4),5)}. すなわち, GAA に関しては肝障害の有無で異なったパターンが見られ, 肝障害を伴わない急性腎不全患者では血清 GAA が低値を示す一方, 急性肝不全患者では著明な血清 GAA の増加を認めた³⁾. そこで, ラットを用いて急性肝不全モデルを作成し, 血清・肝臓・腎臓の Guanidino 化合物を分析した. その結果, 肝不全の場合, 代謝を代償的に行なう場としての腎臓の役割について, 若干の知見を得たので報告する.

実験方法

(1)材料

実験には雄性ウィスター系ラット (平均体重 225gr) を用い, 自由摂食・摂水により飼育した.

(2)方法

塩酸 D-ガラクトサミンを生理食塩水に溶解し pH6.8 に調整したものを, ラット腹腔内に 1,000 mg/kg 投与して急性肝不全モデルを作成した⁹⁾. 投与後 24 時間群を A 群, 投与後 40 時間群を B 群

とし, D-ガラクトサミン非投与のものをコントロール (C 群) とした. 各群のラットはペントバルビタール 50mg/kg 腹腔内投与で麻酔した後, 採血し, 冷却したヘパリン加生理食塩水で肝・腎を灌流し, 肝実質・腎皮質を採取した. 各組織は湿重量の 2 倍の緩衝液 (pH7.4, 10mM Trishydroxymethylaminomethane, 0.34M Sucrose) を加えホモジネートした後, 12,000G で遠心分離し, その上清 (細胞質・ミクロソーム分画) を試料とした. 血液は血清を試料とした.

各試料は終濃度 10% トリクロル酢酸で除蛋白処理し, 0.45 μ m のメンブレンフィルター (ミリポアコーポレーション製) で濾過した後, LC-3A 高速液体クロマトグラフィー (島津社製, ISC-05/S0504 カラムを装着) を用い, Guanidino 化合物を測定した. 測定条件は, 溶離液としてクエン酸緩衝液を用いたステップグラディエント方式による溶出法で, 55 $^{\circ}$ C の定常温度下でニンヒドリン反応を用いた. 分析した Guanidino 化合物は, Guanidino コハク酸 (guanidino-succinic acid : GSA), クレアチン (creatinine : CR), Guanidino 酢酸 (guanidino acetic acid : GAA), N-アセチルアルギニン (N-acetylarginine : NAA), Guanidino プロピオン酸 (guanidinopropionic acid : GPA), Guanidino 酪酸 (guanidino butyric acid : GBA), アルギニン (arginine : ARG), Guanidino (guanidine : G), メチル Guanidino (methyl guanidine : MG) である. 各 Guanidino 化合物の濃度計算は, クロマトパック C-RIA を用いて自動計算処理を行った. ついで, 各試料について蛋白定量 (ブラッドフォード法) を行い, 蛋白量あたりの

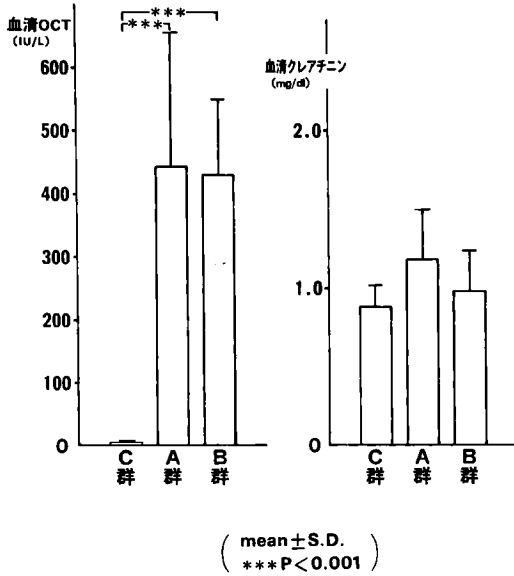


図1. 血清 OCT, クレアチニン値

グアニジノ化合物濃度を算出した。

また、血清については、オルニチンカルバモイルトランスフェラーゼ（以下 OCT と略す）活性を和光純薬製 OCT テスト[®]により、クレアチニンを和光純薬製クレアチニンテスト[®]により、測定した。

結 果

- (1) 血清 OCT 活性は C 群 4.45 ± 3.22 IU/L (n=9) に比べ、A 群 440.6 ± 232.7 IU/L (n=9), B 群 433.4 ± 117.2 IU/L (n=9) と著明な高値を示し、有意差が認められた (図-1, 表-2).
- (2) 血清クレアチニン値は C 群 0.88 ± 0.17 mg/dl (n=6) に比べ、A 群 1.19 ± 0.31 mg/dl (n=15), B 群 0.97 ± 0.28 mg/dl (n=11) で、有意の差を示さなかった (図-1, 表-2).
- (3) グアニジノ化合物分析の結果、表-1 に示すように、CR, GAA, GBA, ARG が検出された。その他のグアニジノ化合物は明確なピークとしては検出されなかった。実測値については

表1. 結果のまとめ1

	C 群 (8)			A 群 (16)			B 群 (16)		
	肝	腎皮質	血清	肝	腎皮質	血清	肝	腎皮質	血清
CR	9.31 \pm 3.52	93.55 \pm 34.39	27.18 \pm 9.88	8.41 \pm 2.53	44.86 \pm 13.33	21.33 \pm 8.06	14.19 \pm 6.33	69.81 \pm 21.49	28.09 \pm 13.77
GAA	0.053 \pm 0.027	6.98 \pm 1.89	0.12 \pm 0.036	0.034 \pm 0.018	4.97 \pm 2.38	0.087 \pm 0.037	0.082 \pm 0.036	5.65 \pm 1.47	0.22 \pm 0.10
GBA	0.57 \pm 0.14	0.48 \pm 0.12	0.012 \pm 0.0057	0.71 \pm 0.26	0.53 \pm 0.13	0.026 \pm 0.013	0.67 \pm 0.35	0.53 \pm 0.17	0.028 \pm 0.010
ARG	0.48 \pm 0.21	31.37 \pm 6.88	2.86 \pm 0.86	0.57 \pm 0.12	29.04 \pm 10.38	0.39 \pm 0.20	0.85 \pm 0.43	23.63 \pm 5.20	0.48 \pm 0.47

mean \pm S.D. ()内は n 数

単位 = n mol/mg·cytosol protein (肝・腎皮質)
n mol/mg·protein (血清)

- * P < 0.05
- ** P < 0.01
- *** P < 0.001

表2 結果のまとめ2

	C 群	A 群	B 群
血清OCT (IU/L)	4.45±3.22 (9)	440.6±232.7 (9)	433.4±117.2 (9)
血清クレアチニン (mg/dl)	0.88±0.17 (6)	1.19±0.31 (15)	0.97±0.28 (11)
[腎皮質ARG] [血清ARG] (ratio)	11.36±2.86 (8)	137.40±88.49 (16)	176.54±135.53 (16)
[腎皮質ARG] [腎皮質GAA] (ratio)	4.51±1.11 (8)	4.87±1.58 (16)	4.45±1.24 (16)
[血清ARG] [血清GAA] (ratio)	32.35±14.26 (8)	3.43±1.84 (16)	2.36±2.29 (16)
[腎皮質CR] [腎皮質GAA] (ratio)	10.60±3.50 (8)	7.79±4.26 (16)	18.47±9.48 (16)
[肝GBA] [血清GBA] (ratio)	46.53±17.30 (8)	21.30±10.90 (16)	21.14±14.46 (16)

mean±S.D. ()内はn数

** P<0.01

*** P<0.001

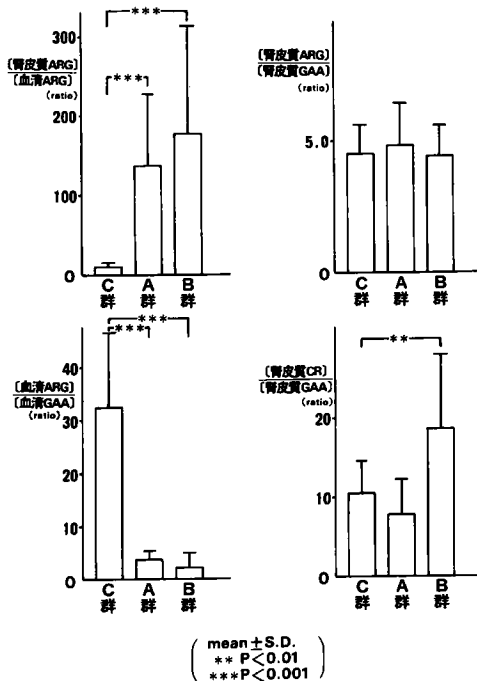


図2 グアニジノ化合物間の濃度比 (ARG, GAA, CR)

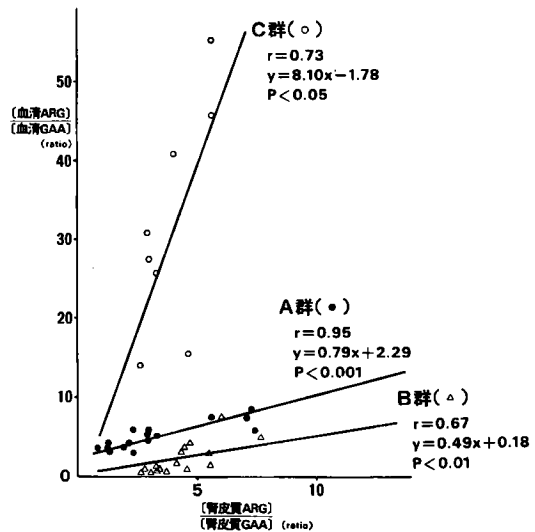


図3 [血清ARG] / [血清GAA] と [腎皮質ARG] / [腎皮質GAA] の相関

それぞれ平均値と標準偏差を求め、t 検定を行った。また、それぞれの試料について表 2 に示すごとくグアニジン化合物間の比率を求め、同様の統計処理を行った。

(4) 血清 ARG は、C 群 $2.86 \pm 0.86 \text{ nmol/mg} \cdot \text{protein}$ (n=8) に比べ、A 群 $0.39 \pm 0.20 \text{ nmol/mg} \cdot \text{protein}$ (n=16)、B 群 $0.48 \pm 0.47 \text{ nmol/mg} \cdot \text{protein}$

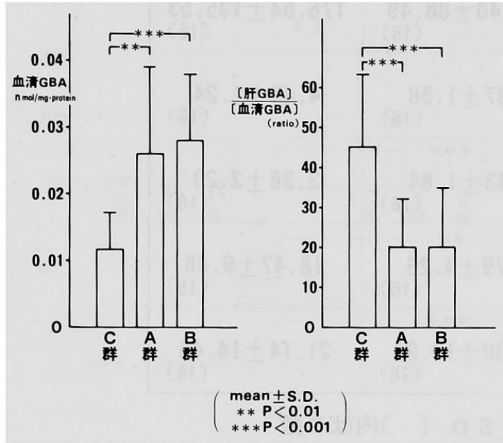


図 4 血清、肝の GBA の変化

tein(n=16)と有意に低下した。腎皮質 ARG は、C 群 $31.37 \pm 6.88 \text{ nmol/mg} \cdot \text{cytosol protein}$ (n=8) に比べ、A 群は $29.04 \pm 10.38 \text{ nmol/mg} \cdot \text{cytosol protein}$ (n=16) と有意差がなかったが、B 群は $23.63 \pm 5.20 \text{ nmol/mg} \cdot \text{cytosol protein}$ (n=16) と有意に低下した (表 1)。

〔腎皮質 ARG〕は、C 群 11.36 ± 2.86 (n=8) に対し、A 群 137.40 ± 88.49 (n=16)、B 群 176.54 ± 135.53 (n=16) と経時的に有意に上昇した (図 2、表 2)。

(5) 腎皮質 GAA は、C 群 $6.98 \pm 1.89 \text{ nmol/mg} \cdot \text{cytosol protein}$ (n=8) に対し、A 群 $4.97 \pm 2.38 \text{ nmol/mg} \cdot \text{cytosol protein}$ (n=16) とやや低下したが、B 群は $5.65 \pm 1.47 \text{ nmol/mg} \cdot \text{cytosol protein}$ (n=16) で有意差を示さなかった。血清 GAA は、C 群 $0.12 \pm 0.036 \text{ nmol/mg} \cdot \text{protein}$ (n=8) に対し、A 群では $0.087 \pm 0.037 \text{ nmol/mg} \cdot \text{protein}$ (n=16) と低下し、B 群では $0.22 \pm 0.10 \text{ nmol/mg} \cdot \text{protein}$ (n=16) と上昇した (表 1)。さらに腎皮質と血清において ARG と GAA の比率を求めたところ、次の結果を得た。

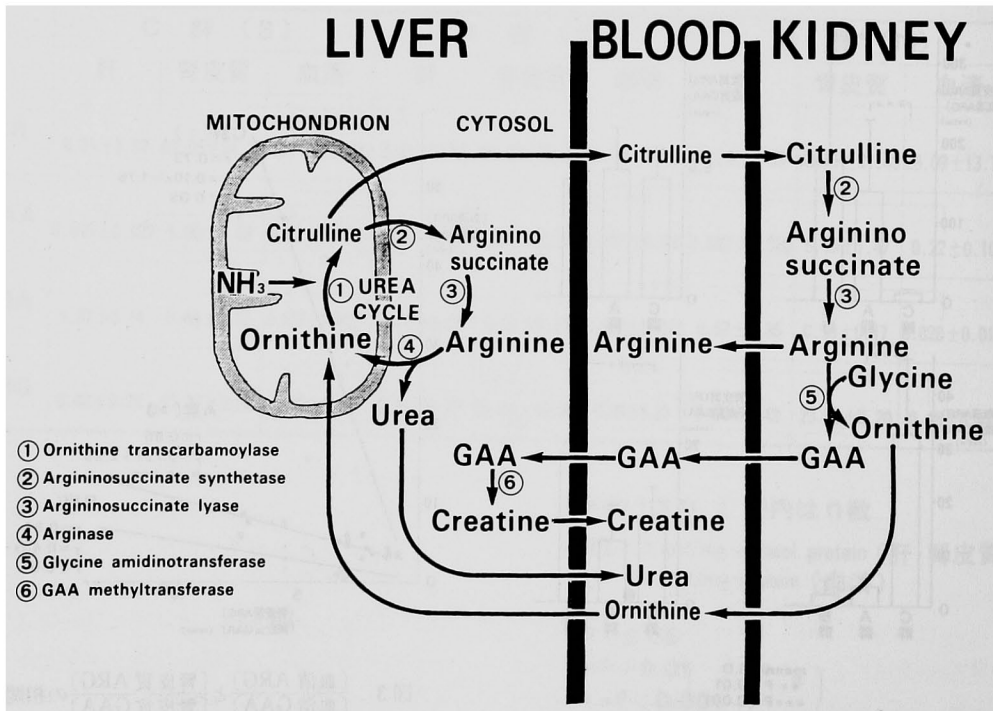


図 5 Urea cycle における肝腎代謝相関 (ラット) 文献7)より引用

$\frac{[\text{腎皮質 ARG}]}{[\text{腎皮質 GAA}]}$ は、C群 4.51 ± 1.11 (n=8), A群 4.87 ± 1.58 (n=16), B群 4.45 ± 1.24 (n=16)と有意差を示さなかった(図2, 表2).

$\frac{[\text{血清 ARG}]}{[\text{血清 GAA}]}$ は、C群 32.35 ± 14.26 (n=8)に比べ、A群 3.43 ± 1.84 (n=16), B群 2.36 ± 2.29 (n=16)と著明に低下した(図2, 表2).

$\frac{[\text{血清 ARG}]}{[\text{血清 GAA}]}$ と $\frac{[\text{腎皮質 ARG}]}{[\text{腎皮質 GAA}]}$ の相関を調べたところ、図3のような結果になった。すなわち、C群では $y = 8.10x - 1.78$ ($r = 0.73$, $p < 0.05$), A群では $y = 0.79x + 2.29$ ($r = 0.95$, $p < 0.001$), B群では $y = 0.49x + 0.18$ ($r = 0.67$, $p < 0.01$)という相関が認められた。

(6) CR は、C群肝の 9.31 ± 3.52 nmol/mg・cytosol protein (n=8)に対し、B群肝で 14.19 ± 6.33 nmol/mg・cytosol protein (n=16)と増加した。また、C群腎皮質の 93.55 ± 34.39 nmol/mg・cytosol protein (n=8)に対し、A群腎皮質で 44.86 ± 13.33 nmol/mg・cytosol protein (n=16)と低下した(表1)。他のグアニジノ化合物との関係では、 $\frac{[\text{腎皮質 CR}]}{[\text{腎皮質 GAA}]}$ が、C群 10.60 ± 3.50 (n=8)に対し、B群で 18.47 ± 9.48 (n=16)と有意差を示した(図2, 表2)。

(7) GBA は肝・腎皮質で検出され、血清にも少量認められた(表1)。血清 GBA は、C群 0.012 ± 0.0057 nmol/mg・protein (n=8)に比べ、A群で 0.026 ± 0.013 nmol/mg・protein (n=16), B群で 0.028 ± 0.010 nmol/mg・protein (n=16)と有意に上昇した(図4, 表1)。 $\frac{[\text{肝 GBA}]}{[\text{血清 GBA}]}$ は、C群 46.53 ± 17.30 (n=8)に比べ、A群 21.30 ± 10.90 (n=16), B群 21.14 ± 14.46 (n=16)と低値となった(図4, 表2)。

考 察

急性肝不全では肝壊死が急速に広汎に進行し、肝細胞蛋白やその他の体蛋白が崩壊する結果、血漿アミノ酸やアンモニア等の窒素化合物が増加する。これら異常に増加した血漿アミノ酸や窒素化合物を処理する系としては、肝臓でのア

ミノ酸分解と尿素サイクルとが必要である。尿素サイクルは、図5に示すように、アンモニアを処理し尿素として排泄する経路で、入口の酵素 Ornithine transcarbamoylase が肝細胞ミトコンドリア内にのみ存在するため、肝臓に局在している。Argininosuccinate synthetase や Argininosuccinate lyase の活性は肝臓について腎臓で高く⁶⁾、腎臓は血中のCitrulline をとりこんでARGを合成する¹⁾。肝臓で合成されたARGはArginaseにより直ちに尿素に転換される。腎臓で合成されたARGは、血中に放出され各組織で利用されるものと、Glycine amidinotransferase により代謝されGAAになるものがある。このGlycine amidinotransferaseは、霊長類では腎臓以外に肝臓でもわずかに活性が認められているが、ラットでは腎臓にのみ活性が認められている⁷⁾。腎臓でできたGAAは、尿中に排泄されるものと、血中に放出され肝臓にとりこまれるものがあり、肝臓ではGAAはGAA methyltransferase によりCRに代謝される。CRは血中に出た後、骨格筋でCreatinineに代謝され、尿中に排泄される。以上のことから、腎臓は排泄型窒素化合物としてGAAを生合成していると推論されており、その変動が腎機能の指標として有用であると考えられている⁸⁾。また、GAAの合成排泄には血中CR濃度が影響し、CRがGlycine amidinotransferaseに負のフィードバックをかける一方、GAA排泄を促進する方向に作用すると考えられている⁹⁾。尿素サイクルにおけるこれらの肝臓の代謝の関係が、肝障害もしくは腎障害を起こした場合にどのように変化するかが、窒素化合物処理の面で興味深い。現在のところ明確にされていない。臨床症例で血中グアニジノ化合物分析を行った結果では、急性腎不全患者では血中GAAが一樣に低値を示す傾向がある⁴⁾。それに比べて、急性肝不全患者では血中GAAは非常に高い値を示しており、腎機能が保たれている間は血中CRは正常値である³⁾。これは肝不全により肝臓での代謝機能が低下した結果、代償的に腎臓でのCitrulline代謝が賦括されGAAが増加し、そのGAAからCRへの肝臓での転換が減少したためであると考えている。また、CRが上昇

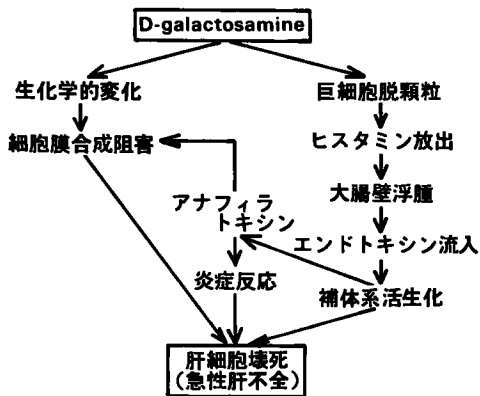


図6. D-galactosamine による肝障害の発生機序

しない間は Glycine amidinotransferase への抑制がかからず、排泄型窒素化合物としてのGAAを合成する腎臓の代償能が働き続けると考えられる³⁾。以上の臨床症例から推論された腎臓の代償能を実証する目的で、本実験ではラット急性肝不全モデルを作成し、そのグアニジノ化合物の変動を調べた。

急性肝不全モデルは Grün らの方法⁹⁾に従い、D-ガラクトサミン1,000mg/kg 腹腔内投与後24時間群(A群)、40時間群(B群)ともに、肝細胞崩壊の程度を示す酵素 OCT の活性は非常に高く、両群とも広汎な肝細胞崩壊が起こったと考えられる。D-ガラクトサミンによる肝障害発生機序は、図6に示すように、生化学的機序とエンドトキシン血症を介する機序がいられている^{9),10),11)}。即ち、D-ガラクトサミンが肝臓のガラクトース回路で代謝される過程で肝細胞内のウリジン成分が欠乏し、肝細胞の蛋白合成能が低下して膜欠損が生じ、肝臓に病変が限局する^{9),11)}。またD-ガラクトサミン投与で巨細胞脱顆粒が起こり、ヒスタミンが大量に放出されて大腸に浮腫が生じ、大腸内細菌が産生したエンドトキシンが吸収され、エンドトキシン血症が起こるといふ。その結果生じる補体系の活性化、凝固線溶系の異常、炎症反応、網内系の変化等があいまって、肝細胞障害を起こす¹¹⁾(図8)。

ラット急性肝不全モデルのグアニジノ化合物分析の結果、以下に述べる事が考察された。ARGはA・B・C各群とも、腎皮質に高濃度に認

められた。腎皮質 ARG は、C群に比べA群では有意差がなく、B群でやや低い値であった。

一方、血清 ARG は、C群に比べA群・B群ともに有意に低い値であった。腎臓で合成されたARGがどの程度の割合で血液に出ているかを知るために、 $\frac{[\text{腎皮質 ARG}]}{[\text{血清 ARG}]}$ の比をとってみ

たところ、C群に比べA群・B群とも有意に高い値であり(表2、図2)、急性肝不全群では腎臓のARGが血液中に放出される割合が減少すると考えられた。ARGの代謝産物としては、肝臓では尿素、腎臓ではGAAが知られており(図5)、その他にGSAもARGから代謝されてできると推測されている²⁾が、証明はされていない。本実験でGAAは各群とも腎皮質に高濃度に認められた。腎皮質GAAはC群に比べ、A群でやや低値で、B群は有意差を示さなかった。血清GAAは、C群に比べA群で低値で、B群で有意に高い値であった。したがってB群ではGAA合成が亢進しているといえる。さらに、血清と腎皮質におけるARGとGAAの比率を求め、腎臓での代謝の変化を血清中から知ることができないか、検討を加えた。

$\frac{[\text{腎皮質 ARG}]}{[\text{腎皮質 GAA}]}$ は、A・B・C各群とも有意差を示さなかった。 $\frac{[\text{血清 ARG}]}{[\text{血清 GAA}]}$ は、C群に比べ、A群・B群ともに有意に低い値であった(表2、図2)。

$\frac{[\text{腎皮質 ARG}]}{[\text{腎皮質 GAA}]}$ と $\frac{[\text{血清 ARG}]}{[\text{血清 GAA}]}$ の相関を調べたところ、C群で $y=8.10x-1.78$ ($r=0.73$, $p<0.05$)、A群で $y=0.79x+2.29$ ($r=0.95$, $p<0.001$)、B群で $y=0.49x+0.18$ ($r=0.67$, $p<0.01$) という相関がみられた(図3)。各群の回帰式が異なってくるのは、血清ARGがA・B群で著明に低下してくるためと思われる。このような相関がみられることから、腎臓でのARGからGAA合成の程度を、 $\frac{[\text{血清 ARG}]}{[\text{血清 GAA}]}$ の値から推測できると考えられる。臨床症例においても、 $\frac{[\text{血清 ARG}]}{[\text{血清 GAA}]}$ が腎機能の変化と類似した変化を示すことを確認している。

次に、肝臓でGAAからできるというCRで

あるが、本実験では腎皮質からも検出されており、GAAが腎臓でもCRに代謝される可能性が示唆された。肝臓のCRは、C群に比べA群は有意差がなく、B群は高値であった。B群は血清GAAが増加しており、これが代謝されてCRになるため、CRが高値になると考えられる。

また、 $\frac{[\text{腎皮質 CR}]}{[\text{腎皮質 GAA}]}$ はC群に比べA群は有意

差がなく、B群は高値であった。これは、増加したCRがGlycine amidinotransferaseに負のフィードバックをかけてGAA合成を抑制したり、またGAAの尿中排泄を促進させたりすることがいわれており⁸⁾、こういったCRのGAA合成・排泄への関与が考えられる。

その他のグアニジノ化合物としては、GBAは生合成機序の判明していない物質であるが、本実験ではラット肝臓・腎臓に高濃度に認められた。そして、C群に比べ、A群・B群とも有意に高い値をとり、肝障害とともに血中に放出

される傾向がみられた。

結 語

急性肝不全時、肝臓の尿素サイクルに障害が生じ、増加したアンモニアを処理する系として腎臓での代謝系が賦活されていると考えられた。

また、 $\frac{[\text{血清 ARG}]}{[\text{血清 GAA}]}$ が $\frac{[\text{腎皮質 ARG}]}{[\text{腎皮質 GAA}]}$ と相関す

ることが、対照群・肝不全群ともにみられ、

$\frac{[\text{血清 ARG}]}{[\text{血清 GAA}]}$ の測定により、腎臓の代償能の程

度が評価できると結論された。さらに、GBAが肝臓・腎臓から高濃度に検出され、肝障害に伴い血中に放出される傾向がみられた。

本稿の要旨は、第31回日本麻酔学会(福岡, 1984)において発表した。稿を終えるにあたり、ご校閲をいただいた岡山大学医学部麻酔学教室、小坂二度見教授に深く感謝いたします。

文 献

1. Funahashi, M., Kato, H., Shiosaka, S. and Nakagawa, H.: Formation of arginine and guanidino acetic acid in the kidney in vivo. Their relations with the liver and their regulation. *J. Biochem.* **89**, 1347—1356, 1981.
2. Cohen, B.D.: Guanidino succinic acid in uremia. *Arch. Intern. Med.* **126**, 846—850, 1970.
3. 西谷恭子, 落合陽治, 雁木千恵子, 松田力哉, 香曾我部義則, 板野義太郎, 小坂二度見: 急性腎不全を伴う劇症肝炎におけるグアニジノ化合物の動態。腎と透析, **16**, 557—561, 1984.
4. Kōsogabe, Y., Ochiai, Y., Matsuda, R., Nishitani, K., Abe, S., Itano, Y., Yamada, T. and Kosaka, F.: Guanidino compounds in patients with acute renal failure. In *Guanidines*, ed. A. Mori, B.D. Cohen, & A. Lowenthal, Plenum Publishing Corporation, New York, pp. 287—294, 1985.
5. 落合陽治, 雁木千恵子, 松田力哉, 西谷恭子, 香曾我部義則, 板野義太郎, 小坂二度見: 急性腎不全におけるエンドトキシンのグアニジノ化合物に及ぼす影響。医学のあゆみ, **130**, 815—817, 1984.
6. Kato, H., Oyamada, I., Funahashi, M. and Nakagawa, H.: New radio isotopic assays of argininosuccinate synthetase and argininosuccinase. *J. Biochem.* **79**, 945—953, 1976.
7. 中川八郎: 動物組織におけるアルギニン, プロリン代謝。代謝マップ—経路と調節(日本生化学会編)。東京化学同人, 東京, pp 48—49, 1980.
8. 葛野公明, 入江章子, 久城英人, 児玉順三, 佐谷 誠, 林 長蔵, 宮井 潔: グアニジノ酢酸分析による腎機能の解析。医学のあゆみ, **121**, 419—421, 1982.
9. Grün, M., Liehr, H. and Rasenack, U.: Significance of endotoxaemia in experimental "galactosamine-hepatitis" in the rat. *Acta Hepato-Gastroenterol.* **23**, 64—81, 1976.
10. Blitzer, B.L., Waggoner, J.G., Jones, E.A., Gralnick, H.R., Towne, D., Butler, J., Weise, V., Kopin, I.J., Walters, I., Goodman, D.G. and Berk, P.D.: A model of fulminant hepatic failure in the rabbit. *Gastroenterology* **74**, 664—671, 1978.

11. Liehr, H., Grün, M., Seelig, H.P., Seelig, R., Reutter, W. and Heine, W.D.: On the pathogenesis of galactosamine hepatitis. *Virchows Arch. B. Cell Pathol.* **26**, 331—344, 1978.

**Metabolic role of the kidney in acute hepatic failure
(Guanidino compounds and the metabolic relationship
between the liver and kidney)**

Kyoko NISHITANI

Department of Anesthesiology, Okayama University Medical School

(Director: Prof. F. Kosaka)

A metabolic relationship between the liver and kidney exists in combination with the urea cycle. We found different concentrations of serum guanidino compounds between patients with acute renal failure and those with acute hepatic failure. We made an experimental model of acute hepatic failure in rats by injecting 1,000 mg/kg of D-galactosamine i.p. and evaluated the metabolic changes in the liver and kidney by measuring guanidino compound levels using high performance liquid chromatography. We concluded that when the urea cycle was disturbed, the metabolism in the kidney was activated, and the synthesis of GAA (guanidino acetic acid) was accelerated for the purpose of excreting ammonium. Also, we thought it possible to evaluate the metabolic compensative ability of the kidney by determining (serum Arginine)/(serum GAA). In the liver and kidney of rats, we found high levels of GBA (guanidino butyric acid), the metabolic pathway of which is unknown. With the progress of liver damage, the release of GBA into the serum was observed.